昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2007，50（10）：1016 – 1021 ISSN 0454-6296

家蚕传染性软化病病毒（桐乡株）VP1 基因片段的克隆及序列分析

满娜娜，陆奇能，金　伟，张　凡，鲁兴萌*

（浙江大学动物科学学院无脊椎动物病理学研究室，杭州　310029）

摘要：以首株在中国分离到的家蚕传染性软化病病毒（*Bombyx mori* infectious flacherie virus，BmIFV）BmIFV-CHN001 基因组为模板，扩增了编码主要结构蛋白的 VP1 基因。克隆测序后得到 VP1 基因片段 906 bp。该序列与已发表的日本毒株相比，核苷酸序列的相似性为 99.3%，编码氨基酸的相似性为 100%，证明该毒株与家蚕传染性软化病病毒日本株的同源性较高。把 BmIFV-CHN001 的 VP1 序列与同属的另外 6 个昆虫小 RNA 病毒的结构蛋白进行序列比对，构建系统发育树，对其进化关系进行了初步分析，结果显示这 7 种病毒具有相近的亲缘关系，而 BmIFV-CHN001 与蜜蜂囊雏病毒的亲缘关系最近。

关键词：家蚕；传染性软化病病毒；VP1 基因片段；结构蛋白；克隆；序列分析

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296（2007）10-1016-06

Cloning and sequence analysis of VP1 gene fragment from a strain of infectious flacherie virus isolated in Zhejiang, China

MAN Na-Na, LU Qi-Neng, JIN Wei, ZHANG Fan, LU Xing-Meng* (Laboratory of Invertebrate Pathology, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: BmIFV-CHN001 is the first strain of infectious flacherie virus isolated in China. In this study, the sequence of VP1 gene fragment coding the main structural protein of BmIFV-CHN001 was amplified. Subsequent cloning and sequencing showed that the sequence fragment was 906 nucleotides in length. Comparison with the VP1 gene of the published Japanese strain indicated that the nucleotide sequence similarity was 99.3% while the amino acid sequence similarity was up to 100%, suggesting that BmIFV-CHN001 was highly homologous to the Japanese strain. Amino acid sequences alignment was performed based on the main structural proteins from BmIFV-CHN001 and other six viruses belonging to the same genus, *Iflavirus*. A phylogenetic tree was constructed. The results showed that there were close relationships among the seven viruses, while BmIFV-CHN001 had the closest relationship with the sacbrood virus of the honey bee.

Key words: *Bombyx mori*; infectious flacherie virus; VP1 gene fragment; structural protein; cloning; sequence analysis

传染性软化病是一种严重影响蚕业生产的流行病，其病因曾被认为是细菌感染和生理不适。Paillot（1926）最早推测家蚕软化病由病毒引起（吕鸿声，1998），Ayuzawa（1972）首次应用超速离心的方法从家蚕体内获得该病的病原——传染性软化病毒（infectious flacherie virus）。电子显微镜观察到直径为 26 ± 2 nm，呈正二十面体（球状）的病毒粒子。Isawa 等（1998）完成了家蚕传染性软化病病毒（*Bombyx mori* infectious flacherie virus，BmIFV）的基因组测序，确定其为 9 650 个核苷酸的正链 RNA 病毒，并归入昆虫类小 RNA 病毒。在相当长一段时间内，除日本之外的诸多养蚕国都未分离到确定的毒株。我国对家蚕软化病的研究由来已久，但是一些疑似软化病的病例最终被确定是家蚕浓核病病毒

基金项目：国家重点基础研究发展计划‘973’项目（2005CB121003）

作者简介：满娜娜，女，1983 年生，山东威海人，硕士研究生，E-mail：nnman521@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：xmlu@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2007-04-17；**接受日期** Accepted：2007-07-30

(*Bombyx mori* densonucleosis virus，BmDNV)感染(岩下嘉光和曹诒孙，1983)。2002 年，本研究室从浙江桐乡蚕区的疑似病蚕中分离到一株病毒，确定为 BmIFV，命名为 BmIFV-CHN001(陆奇能等，2007)。同时利用多抗免疫双扩散试验对蚕区疑似病蚕进行流行状态调查，发现该病毒的感染检出率约为 30%(朱宏杰等，2006)。

BmIFV 的基因组为单链正链 RNA，基因组仅含一个大的开放阅读框(ORF)，编码一个多聚蛋白(polyprotein)，多聚蛋白随后再被加工处理成若干成熟的结构蛋白(衣壳蛋白)和非结构蛋白(复制蛋白)。Hashimoto 和 Kawase(1983)研究确定 BmIFV 坂城株病毒成熟衣壳蛋白的结构蛋白有 4 种，按分子量大小依次命名为 VP1(35.2 kD)、VP2(33.0 kD)、VP3(31.2 kD)和 VP4(11.6 kD)，且每个病毒粒子中含这 4 种蛋白分子的数目分别为 62、57、54 和 31。Isawa 等(1998)则通过已报道的结构蛋白 N 端序列(Choi *et al*.，1992)，结合测得的全基因组推导出 4 个结构蛋白的氨基酸序列，确定 4 个结构蛋白在前体多聚蛋白上的排列顺序为 VP3、VP4、VP1 和 VP2(从 N 端到 C 端)，并计算出它们的理论值分子量分别为 32.8 kD、26.5 kD 和 8.2 kD(VP2 的完整序列和分子量因缺乏下一个蛋白 2 A 的 N 端信息而无法推导)。所有 4 种结构蛋白的酸性氨基酸残基数都比碱性氨基酸多，不含半胱氨酸。而 VP1 是碱性最强的蛋白，VP3 是酸性最强的蛋白，等电点的递降次序为 VP1、VP2、VP4 和 VP3，与各蛋白中碱、酸性氨基酸的比例相一致。如果疏水性氨基酸与亲水性氨基酸的比例决定蛋白质的带电性，那么 VP1 是 BmIFV 结构蛋白中疏水性最强的蛋白，或是粘性蛋白(sticky protein)(吕鸿声，1998)。

昆虫小 RNA 病毒的分子生物学研究起步较晚，1999 年才首次报道了蜜蜂囊雏病毒(sacbrood virus of the honey bee，SBV)的全基因组序列。所有昆虫小 RNA 病毒在科以下的分类尚未最后确定。近年来，随着昆虫小 RNA 病毒基因组序列的测定和结构分析，它们的亲缘关系逐渐明朗化。其中 BmIFV(Isawa *et al*.，1998)、SBV(Ghosh *et al*.，1999)和榕透翅毒蛾小 RNA 病毒(*Perina nuda* picorna-like virus，PnPV)(Wu *et al*.，2002)显示了较清晰的系统进化关系，被归类为同一个属 *Iflavirus*(Mayo，2002)。除去以上 3 个确定的种，另外一些昆虫小 RNA 病毒通过基因组结构分析，也被认为应归入 *Iflavirus* 属，如茶尺蠖小 RNA 病毒(*Ectropis obliqua* picorna-like virus，EoPV)(Wang *et al*.，2004)、蜜蜂云翅病毒(deformed wing virus，DWV)(Lanzi *et al*.，2006)、Kakugo 病毒(kakugo virus，KV)(Fujiyuki *et al*.，2004)和狄斯瓦螨病毒(*Varroa destructor* virus，VDV)(Ongus *et al*.，2004)。

本研究克隆测序了 BmIFV-CHN001 主要结构蛋白 VP1 的基因片段，并以 VP1 基因片段为基础，分析了 BmIFV-CHN001 与已公布的日本毒株之间的相似性。同时，将 BmIFV-CHN001 的 VP1 序列与同属的昆虫小 RNA 病毒的结构蛋白进行了序列对比，并构建了进化树。

1　材料与方法

1.1　病毒与试剂

家蚕传染性软化病病毒中国桐乡株(BmIFV-CHN001)，由本实验室分离并保存。

常见化学试剂为国产分析纯试剂。Trizol 和胶回收试剂盒 EZ Spin Column DNA Gel Extraction Kit 购自上海生工公司。Taq 酶、*Hin*d Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、DNA marker 及 pMD19-T 载体购自 TaKaRa。引物合成和 DNA 测序由英骏(Invitrogen)公司完成。感受态细胞菌种 JM109 来自上海生工公司。

1.2　BmIFV-CHN001 的 VP1 基因片段的 RT-PCR 扩增、克隆和测序

根据家蚕传染性软化病病毒日本株(GenBank 登录号 AB000906)的 VP1 基因两侧保守氨基酸设计 1 对引物 VP1F(5′-GGAATGAGAAATAAGGACAAACC-3′)和 VP1R(5′-ATTCAATATATCATCGTGCATCTC-3′)，用 Trizol 抽取纯化病毒的基因组 RNA，用 Oligo 18(dT)作为引物，按 SuperScript Ⅲ 说明书操作进行反转录，以所获 cDNA 为模板，用 VP1F 和 VP1R 引物进行 PCR 扩增。PCR 产物割胶回收后连接至 pMD19-T 载体，转化大肠杆菌 JM109。挑取白色菌落，用碱裂解法提取重组质粒 pMD19-VP1。经 PCR 和双酶切鉴定，阳性克隆送至上海英骏公司测序。

1.3　序列分析和比对

测序所得序列用 DNAStar 进行初步编辑和分析。选取与 BmIFV 同属的另外 6 个病毒的 VP1 基因氨基酸序列保守区进行序列比对，参考序列均来自 NCBI(表 1)，序列联配用 ClustalX 完成，在 Phylip3.63 中用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树，Bootstrap 重取样循环数为 1 000。

表1 用于比对和进化分析的7种昆虫病毒基因组数据来源

Table 1 The genome of seven insect viruses used for alignment and evolution analysis

昆虫病毒 Insect virus	简称 Abbreviation	GenBank 登录号 GenBank accession no.
家蚕传染性软化病病毒 *Bombyx mori* infectious flacherie virus	BmIFV	EF501998
蜜蜂囊雏病毒 Sacbrood virus of the honey bee	SBV	AF092924
榕透翅毒蛾小 RNA 病毒 *Perina nuda* picorna-like virus	PnPV	AF323747
狄斯瓦螨病毒 *Varroa destructor* virus	VDV	NC _ 006494
蜜蜂云翅病毒 Deformed wing virus	DWV	AY292384
茶尺蠖小 RNA 病毒 *Ectropis obliqua* picorna-like virus	EoPV	AY365064
Kakugo 病毒 Kakugo virus	KV	AB070959

2 结果与分析

2.1 BmIFV-CHN001 的 VP1 基因片段的 RT-PCR 扩增

1%琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增产物，片段大小与预期相符（图1）。

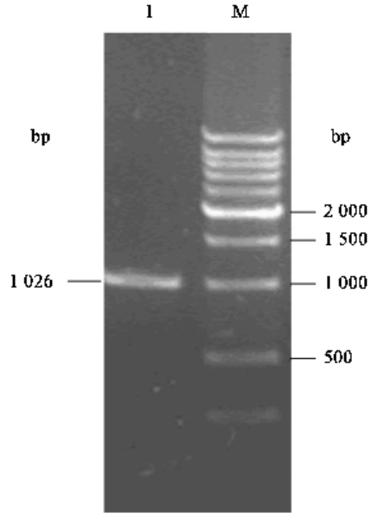


图1 BmIFV-CHN001 的 VP1 基因片段的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification for VP1 gene fragment of BmIFV-CHN001 by RT-PCR

1：VP1 基因片段扩增产物 Amplification for VP1 gene fragment；M：分子量标准 500 bp DNA ladder marker.

2.2 重组质粒的 PCR 与双酶切鉴定

以质粒为模板，用特异性引物 VP1F 和 VP1R 进行 PCR 扩增，获得与预期大小一致的条带（图2）。同时对质粒进行 *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ双酶切（图3）。经分析，VP1 基因内含的一个 *Bam*HⅠ位点（G^GATCC），位于家蚕传染性软化病病毒中国桐乡株（BmIFV-CHN001）基因组的第2 236 碱基处，T 载体上含有一个 *Bam*HⅠ位点和 *Hin*dⅢ（A^AGCTT）位点，因此得到大小为 2 654 bp、726 bp 和 338 bp 的条带。

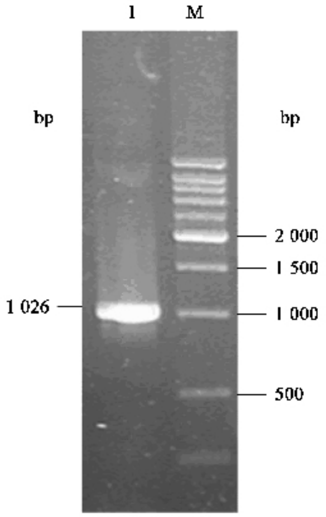


图2 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR

1：pMD19-VP1 的 PCR 鉴定 PCR identification of pMD19-VP1；M：分子量标准 500 bp DNA ladder marker.

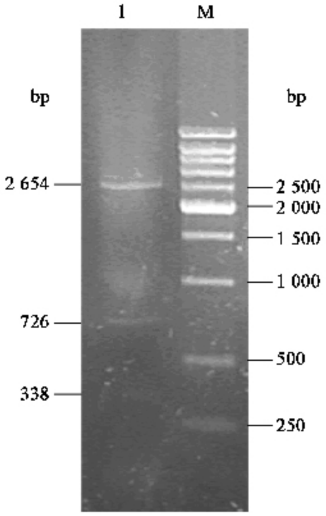


图3 重组质粒双酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by restriction digestion

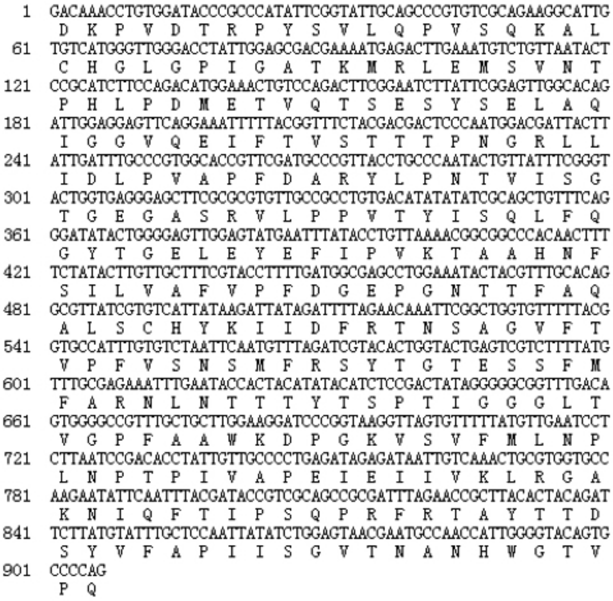
1：pMD19-VP1 的双酶切分析 pMD19-VP1/*Bam*HⅠ + *Hin*dⅢ restriction；M：分子量标准 500 bp DNA ladder marker.

2.3 BmIFV-CHN001 的 VP1 基因片段的测序及基本序列分析

重组质粒经测序，结果显示插入片段正确，为 1 026 bp，包括的 VP1 基因片段为 906 bp，序列已登录 GenBank，登录号为 EF501998。经 DNAStar 软件进行序列分析，该序列共编码 302 个氨基酸(图 4)。与日本株进行同源性比较，结果表明 BmIFV-CHN001 和日本株的核苷酸同源性高达 99.3%，第 33、186、357、525、651 和 684 位的碱基发生突变，但均为同义突变，氨基酸同源性达 100%。

2.4　BmIFV-CHN001 的 VP1 基因片段的同源性比较及分子进化分析

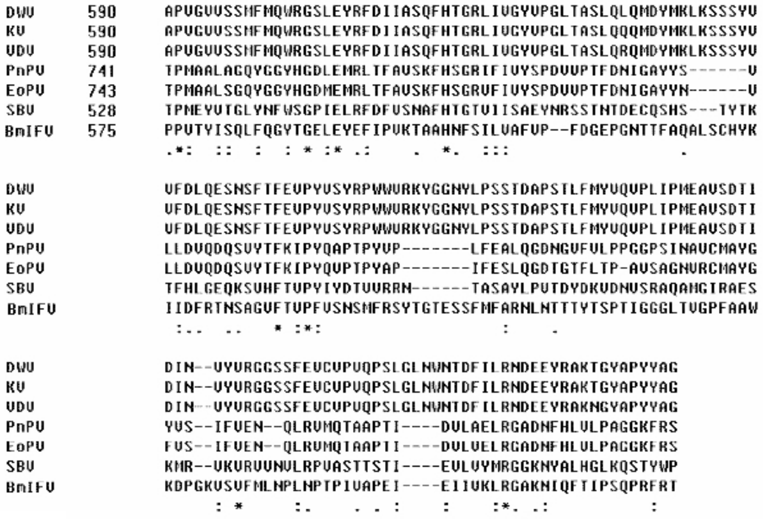
应用 ClustalX 和 Phylip3.63 软件对 7 种昆虫小 RNA 病毒的 VP1 序列进行多重序列比对，多重序列联配显示 *Iflavirus* 属的 7 种病毒的氨基酸序列之间存在着较为明显的保守性(图 5)。



```
  1 GACAAACCTGTGGATACCCGCCCATATTCGGTATTGCAGCCCGTGTCGCAGAAGGCATTG
     D  K  P  V  D  T  R  P  Y  S  V  L  Q  P  V  S  Q  K  A  L
 61 TGTCATGGGTTGGGACCTATTGGAGCGACGAAAATGAGACTTGAAATGTCTGTTAATACT
     C  H  G  L  G  P  I  G  A  T  K  M  R  L  E  M  S  V  N  T
121 CCGCATCTTCCAGACATGGAAACTGTCCAGACTTCGGAATCTTATTCGGAGTTGGCACAG
     P  H  L  P  D  M  E  T  V  Q  T  S  E  S  Y  S  E  L  A  Q
181 ATTGGAGGAGTTCAGGAAATTTTTACGGTTTCTACGACGACTCCCAATGGACGATTACTT
     I  G  G  V  Q  E  I  F  T  V  S  T  T  T  P  N  G  R  L  L
241 ATTGATTTGCCCGTGGCACCGTTCGATGCCCGTTACCTGCCCAATACTGTTATTTCGGGT
     I  D  L  P  V  A  P  F  D  A  R  Y  L  P  N  T  V  I  S  G
301 ACTGGTGAGGGAGCTTCGCGCGTGTTGCCGCCTGTGACATATATATCGCAGCTGTTTCAG
     T  G  E  G  A  S  R  V  L  P  P  V  T  Y  I  S  Q  L  F  Q
361 GGATATACTGGGGAGTTGGAGTATGAATTTATACCTGTTAAAACGGCGGCCCACAACTTT
     G  Y  T  G  E  L  E  Y  E  F  I  P  V  K  T  A  A  H  N  F
421 TCTATACTTGTTGCTTTCGTACCTTTTGATGGCGAGCCTGGAAATACTACGTTTGCACAG
     S  I  L  V  A  F  V  P  F  D  G  E  P  G  N  T  T  F  A  Q
481 GCGTTATCGTGTCATTATAAGATTATAGATTTTAGAACAAATTCGGCTGGTGTTTTTACG
     A  L  S  C  H  Y  K  I  I  D  F  R  T  N  S  A  G  V  F  T
541 GTGCCATTTGTGTCTAATTCAATGTTTAGATCGTACACTGGTACTGAGTCGTCTTTTATG
     V  P  F  V  S  N  S  M  F  R  S  Y  T  G  T  E  S  S  F  M
601 TTTGCGAGAAATTTGAATACCACTACATATACATCTCCGACTATAGGGGGCGGTTTGACA
     F  A  R  N  L  N  T  T  T  Y  T  S  P  T  I  G  G  G  L  T
661 GTGGGGCCGTTTGCTGCTTGGAAGGATCCCGGTAAGGTTAGTGTTTTTATGTTGAATCCT
     V  G  P  F  A  A  W  K  D  P  G  K  V  S  V  F  M  L  N  P
721 CTTAATCCGACACCTATTGTTGCCCCTGAGATAGAGATAATTGTCAAACTGCGTGGTGCC
     L  N  P  T  P  I  V  A  P  E  I  E  I  I  V  K  L  R  G  A
781 AAGAATATTCAATTTACGATACCGTCGCAGCCGCGATTTAGAACCGCTTACACTACAGAT
     K  N  I  Q  F  T  I  P  S  Q  P  R  F  R  T  A  Y  T  T  D
841 TCTTATGTATTTGCTCCAATTATATCTGGAGTAACGAATGCCAACCATTGGGGTACAGTG
     S  Y  V  F  A  P  I  I  S  G  V  T  N  A  N  H  W  G  T  V
901 CCCCAG
     P  Q
```

图 4　BmIFV-CHN001 VP1 **基因片段的核苷酸序列和氨基酸序列**

Fig. 4　Nucleotide sequence and amino acid sequence of VP1 gene fragment from BmIFV-CHN001



```
DWV     590    APVGVVSSMFMQWRGSLEYRFDIIASQFHTGRLIVGYVPGLTASLQLQMDYMKLKSSSYV
KV      590    APVGVVSSMFMQWRGSLEYRFDIIASQFHTGRLIVGYVPGLTASLQQQMDYMKLKSSSYV
VDV     590    APVGVVSSMFMQWRGSLEYRFDIIASQFHTGRLIVGYVPGLTASLQRQMDYMKLKSSSYV
PnPV    741    TPMAALAGQYGGYHGDLEMRLTFAVSKFHSGRIFIVYSPDVVPTFDNIGAYYS------V
EoPV    743    TPMAALSGQYGGYHGDMEMRLTFAVSKFHSGRVFIVYSPDVVPTFDNIGAYYN------V
SBV     528    TPMEYVTGLYNFWSGPIELRFDFVSNAFHTGTVIISAEYNRSSTNTDECQSHS---TYTK
BmIFV   575    PPVTYISQLFQGYTGELEYEFIPVKTAAHNFSILVAFVP--FDGEPGNTTFAQALSCHYK
               .*:  ::  :  : * :* .:    .  *.  :::                 .

DWV            VFDLQESNSFTFEVPYVSYRPWWVRKYGGNYLPSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTI
KV             VFDLQESNSFTFEVPYVSYRPWWVRKYGGNYLPSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTI
VDV            VFDLQESNSFTFEVPYVSYRPWWVRKYGGNYLPSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTI
PnPV           LLDVQDQSVYTFKIPYQAPTPYVP-------LFEALQGDNGVFVLPPGGPSINAVCMAYG
EoPV           LLDVQDQSVYTFKIPYQVPTPYAP-------IFESLQGDTGTFLTP-AVSAGNVRCMAYG
SBV            TFHLGEQKSVHFTVPYIYDTVVRRN------TASAYLPVTDYDKVDNVSRAQAMGIRAES
BmIFV          IIDFRTNSAGVFTVPFVSNSMFRSYTGTESSFMFARNLNTTTYTSPTIGGGLTVGPFAAW
                :..  ..   * :*:                  :    .

DWV            DIN--VYVRGGSSFEVCVPVQPSLGLNWNTDFILRNDEEYRAKTGYAPYYAG
KV             DIN--VYVRGGSSFEVCVPVQPSLGLNWNTDFILRNDEEYRAKTGYAPYYAG
VDV            DIN--VYVRGGSSFEVCVPVQPSLGLNWNTDFILRNDEEYRAKNGYAPYYAG
PnPV           YVS--IFVEN--QLRVMQTAAPTI----DVLAELRGADNFHLVLPAGGKFRS
EoPV           FVS--IFVEN--QLRVMQTAAPTI----DVLVELRGADNFHLVLPAGGKFRS
SBV            KMR--VKVRVVNVLRPVASTTSTI----EVLVYMRGGKNYALHGLKQSTYWP
BmIFV          KDPGKVSVFMLNPLNPTPIVAPEI----EIIVKLRGAKNIQFTIPSQPRFRT
                    : *     :.    . . :    :    :*. .:          :
```

图 5　七种昆虫病毒 VP1 **基因氨基酸序列的部分保守区域**

Fig. 5　Partial conserved regions of amino acid sequences of VP1 genes of seven insect viruses

“ * ’**表示每列氨基酸相同** The asterisk indicates identical amino acid；“ : ’**表示每列有两个不同氨基酸** The colon shows two kinds of amino acid；“ . ’**表示每列有** 3 **个不同氨基酸** The dot punctuation denotes three kinds of amino acid；“ - ’**表示氨基酸缺失** The hyphen indicates absence of amino acid.

以 VP1 基因氨基酸序列保守区构建的系统发育树（图 6）形成 3 个高支持率（＞700/1 000）的分支：VDV、DWV 和 KV 为一支（支持率 1 000/1 000），EoPV 和 PnPV 为另一支（1 000/1 000），BmIFV 和 SBV 则构成支持率相对较低（790/1 000）的一支。

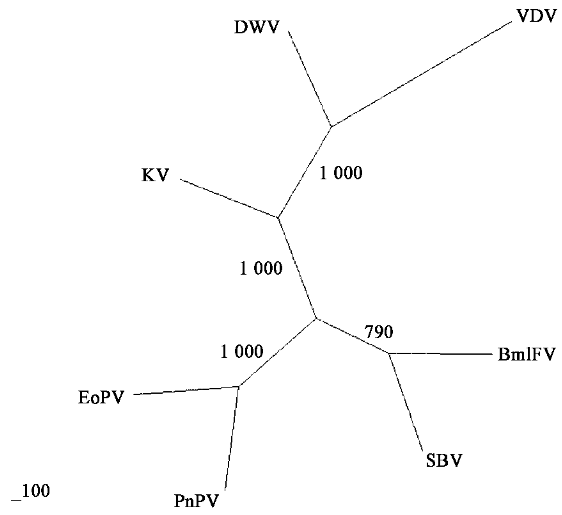


图 6　七种昆虫病毒基于 VP1 基因氨基酸序列保守区的系统发育树

Fig. 6　Phylogenetic tree based on conserved regions in amino acid sequences of VP1 genes of seven insect viruses

3　讨论

一般而言非结构蛋白保守性较强，而结构蛋白（衣壳蛋白）的保守性较低。结构蛋白的高变异率决定了病毒粒子表面抗原特征的多样化，结构蛋白编码区的多态性也常被用于同一病毒种内的亚型分类或分子流行病学调查。

本研究结果表明家蚕传染性软化病病毒中国桐乡株（BmIFV-CHN001）的主要结构蛋白基因 VP1 与日本株高度同源（氨基酸同一性 100%，图 4）。有趣的是印度分离株与日本株和中国株同样高度同源（未发表结果，实验室间交流）。虽然同处亚洲，但三个分离点在地理位置上相隔甚远，因此我们推测，BmIFV 可能是一种变异率较低的病毒。同时，这三株病毒分离点的分布显示了 BmIFV 有可能在亚洲养蚕国广泛分布，并形成一个保守的‘亚洲型’。欧洲和美洲（Cainciarullo *et al*.，1977）虽有类似家蚕传染性软化病病例发生的报道，但未见有关分离毒株和相应的分子鉴定研究，所以亚洲毒株和这些可能存在的 BmIFV 毒株之间的亲缘关系仍无法确定。

虽然 BmIFV 衣壳蛋白的具体拓扑学结构和包装过程并不明了，但 VP1 是 BmIFV 病毒粒子外壳的四种结构蛋白中分子数目最多的（Hashimoto and Kawase，1983），其氨基酸残基数最多，分子量也最大（Isawa *et al*.，1998）。VP1 和 VP4（最小的结构蛋白）由一个前体蛋白 VP0 产生（Choi *et al*.，1992），VP1 和 VP4 之间切割位点两侧的氨基酸对（K/D）不同于其他结构蛋白之间的切割位点（G/P）（Isawa *et al*.，1998），可以推测该切割作用可能不是由病毒的蛋白水解酶 3C 来催化完成，而是类似于哺乳动物小 RNA 病毒科中 VP0 的切割方式（Lawso and Semler，1990；Palmenberg，1990），即在病毒粒子装配末期（核酸壳体化）时由 VP0 自动断裂完成，VP4 包入病毒衣壳内侧，VP1 则构成病毒粒子衣壳外侧的主要部分。用 BmIFV-CHN001 的单抗（朱宏杰等，2006）鉴定含高异性抗原表位的衣壳蛋白，研究它们和 VP1 以及其他衣壳蛋白之间的关系也将有助于开发针对 BmIFV 的高效而特异的血清学检测方法。

昆虫小 RNA 病毒在分子生物学上的研究起步较晚。根据基因组结构和复制酶进化关系，两个主要的分类群已经初露端倪。第一个群已经被命名为二顺反子病毒科（Dicistroviridae），包含一个 *Cripavirus* 属，以蟋蟀麻痹病毒（cricket paralysis virus）为代表种（Mayo，2002）。Dicistroviridae 科病毒基因组含两个 ORF，ORF 间的非编码间隔区可作为内部核糖体进入位点（IRES）起始翻译。Dicistroviridae 科病毒的衣壳蛋白由 3′ORF 编码，非结构蛋白由 5′ORF 编码。另一个群以传染性软化病病毒为代表，构成一个尚未指定科目的属 *Iflavirus*，该属病毒基因组仅含一个大 ORF，且衣壳蛋白位于 ORF 的 5′端。该属同哺乳动物小 RNA 病毒科（Picornaviridae）有着很近的亲缘关系。

有关这个“浮动”的属（floating genus），国际病毒分类学委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）仍在确定是否有足够的证据将其编入 Picornaviridae，作为一个横靠的侧群（Mayo and Ball，2006）。除了 ICTV 确定的三个种（IFV、SBV 和 PnPV）外，最近发现的一些昆虫小 RNA 也被认为应补入 *Iflavirus* 中。Knowles 等通过序列比对认为 *Iflaviurs* 的病毒可分为 5 个组：即 IFV，SBV，PnPV 和 EoPV，DWV、VDV 和 KV 以及 VcPLV（姬蜂科内寄生蜂小 RNA 病毒，*Venturia canescens* picorna-like virus）（http://www.picornaviridae.com/picornavirales/iflavirus/iflavirus.htm.），本研究以 VP1 氨基酸序列保守区构建的进化树（图 6）与这一结果基本吻合。

参 考 文 献 (References)

Ayuzawa C，1972. Studies on the infectious flacherie of the silkworm，*Bombyx mori* L. Ⅰ. Purification of the virus and its some properties. *J. Seric. Sci. Jpn.*，41(5)：338－344.

Cainciarullo AM，Abreu OC，Campos AR，Oliveira JM，July JR，1977. Infectious flacherie first occurrence in *Bombyx mori* L. *Brazil. Biologico.*，43：199－202.

Choi H，Sasaki T，Tomita T，Kobayashi M，Kawase S，1992. Processing of structural polypeptides of infectious flacherie virus of silkworm，*Bombyx mori*：VP1 and VP4 are derived from VP0. *Invertebr. Pathol.*，60：128－131.

Fujiyuki T，Takeuchi H，Ono M，Ohka S，Sasaki T，Nomoto A，Kubo T，2004. Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J. Virol.*，78：1 093－1 100.

Ghosh RC，Ball BV，Willcocks MM，1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee：an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.*，80：1 541－1 549.

Hashimoto Y，Kawase S，1983. Characteristics of structural proteins of infectious flacherie virus from the silkworm，*Bombyx mori*. *Invertebr. Pathol.*，41(1)：68－76.

Isawa H，Asano K，Sahara K，Iizuka T，Bando H，1998. Analysis of genetic information of an insect picorna-like virus，infectious flacherie virus of silkworm：evidence for evolutionary relationships among insect，mammalian and plant picorna(-like) viruses. *Arch. Virol.*，43：127－143.

Iwashita Y，Cao YS，1983. The development of a densonucleosis virus isolated from silkworm larvae，*Bombyx mori* of China. *Science of Sericulture*，9(4)：219－222. [**岩下嘉光，曹诒孙**，1983. **中国株家蚕浓核症病毒的发育**. **蚕业科学**，9(4)：219－222]

Lanzi G，de Miranda JR，Boniotti MB，Cameron CE，Lavazza A，Capucci L，Camazine SM，Rossi C，2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Gen. Virol.*，80：4 998－5 009.

Lawson MA，Semler BL，1990. Picornavirus protein processing-enzyme，substrates，and genetic regulation. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*，161：49－87.

Lu HS，1998. Molecular Biology of Insect Virus. Beijing：Chinese Agricultural Press. 446 pp. [**吕鸿声**，1998. **昆虫病毒分子生物学**. **北京：中国农业出版社**. 446 **页**]

Lu QN，Zhu HJ，Hong J，Jin W，Zhang F，Lu XM，2007. Isolation and identification of an infectious flacherie virus from silkworm，*Bombyx mori* in Zhejiang，China. *Chinese Journal of Virology*，23(2)：143－147. [**陆奇能，朱宏杰，洪健，金伟，张凡，鲁兴萌**，2007. **一株传染性软化病病毒的分离和鉴定**. **病毒学报**，23(2)：143－147]

Mayo MA，2002. Virus taxonomy-Houston. *Arch. Virol.*，147：1 071－1 076.

Mayo MA，Ball LA，2006. ICTV in San Francisco：a report from plenary session. *Arch. Virol.*，151：413－422.

Ongus JR，Peters D，Bonmatin JM，Bengsch E，Vlak JM，van Oers MM，2004. Compte sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.*，85：3 747－3 755.

Paillot A，1926. La fgattine et al flacherie vraieou flacherie de Pasteteur maladies infectieuse mixtes a ultra-microbe et bacteries. *Compt. Rend. Acad. Sci.*，189：308－310.

Palmenberg AC，1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu. Rev. Microbiol.*，44：603－623.

Wang XC，Zhang JM，Lu J，Yi FM，Liu CF，Hu YY，2004. Sequence analysis and genomic organization of a new insect picorna-like virus，*Ectropis obliqua* picorna-like virus，isolated from *Ectropis obliqua*. *J. Gen. Virol.*，85(5)：1 145－1 151.

Wu CY，Lo CF，Huang CJ，Yu HT，Wang CH，2002. The complete genome sequence of *Perina nuda* picorna-like virus，an insect-infecting virus with a genome organization similar to that of the mammalian picornaviruses. *Virology*，294：312－323.

Zhu HJ，Zhao XH，Dai JY，Wu CQ，Wang Y，Lu QN，Lu XM，2006. Antiserum preparation and application of infectious viral flacherie of *Bombyx mori*. *Bulletin of Sericulture*，37(3)：16－19. [**朱宏杰，赵新华，戴建一，吴纯清，王瀛，陆奇能，鲁兴萌**，2006. **家蚕病毒性软化病病毒抗血清的研制及应用**. **蚕桑通报**，37 (3)：16－19]

(责任编辑：黄玲巧)